



**Universidad
Andrés Bello®**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Odontología

Escuela de Odontología

**ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE
ENTEROBACTERIAS Y ENTEROCOCOS EN PULPAS
DENTALES INFECTADAS EXTRAÍDAS PREVIO AL
PROCEDIMIENTO ENDODÓNTICO Y EVALUACIÓN
DE SU RELACIÓN CON EL FRACASO DEL
TRATAMIENTO**

Tesis para optar al título de Cirujano-Dentista

Autor:

Lic. Paulina Cortés Gutiérrez

Docente Guía:

Prof. Dr. Mauricio Bittner Ortega

SANTIAGO – CHILE, 2014

Agradecimientos

Agradezco de manera muy especial a todo el equipo de biotecnología y microbiología oral, por toda la ayuda, paciencia, dedicación y enseñanza que me brindaron durante la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mauricio Bittner, quien tuvo la dedicación y se dio el tiempo de enseñarme paso a paso como trabajar en el laboratorio, estando siempre dispuesto a responder mis dudas e inquietudes.

Agradezco infinitamente a mi amiga y compañera Margarita Orellana Pizarro, que fue colaboradora directa de este proyecto, participando activamente en él, tanto en la parte experimental como en la parte teórica. Gracias por su apoyo, su tiempo, su dedicación y su amistad. Este trabajo debiese ser de ambas.

Agradezco a mi compañero Daniel Pino Díaz, quien me ayudó con la recolección de muestras desde el primer día y siempre estuvo dispuesto a colaborar en lo que fuese respecto a mi investigación, mostrando gran interés por el tema.

Agradezco a la Dra. María Jesús Villegas, quien me brindó su colaboración recolectando muestras en su trabajo, y cuidando de ellas para mi estudio.

Agradezco a todos mis compañeros de internado, que estuvieron pendientes de recolectarme muestras y se dieron el tiempo de rellenar mis fichas, incluso en los momentos de mayor estrés.

Agradezco muy especialmente el apoyo incondicional de mi familia y amigos, que hicieron posible todo esto.

Agradecimientos especiales a cada uno de los pacientes que aportó con una muestra para poder llevar a cabo esta investigación.

Tabla de contenidos

1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	3
3. Hipótesis.....	12
4. Objetivos.....	13
4.1 Objetivo general.....	13
4.2 Objetivos Específicos.....	13
5. Metodología de estudio.....	14
<i>Variables de exposición.....</i>	<i>15</i>
<i>Variables de resultado.....</i>	<i>15</i>
6. Materiales.....	17
6.1 Insumos odontológicos.....	17
6.2 Insumos de laboratorio.....	17
7. Métodos.....	19
7.1 Protocolo de selección de paciente, consentimiento informado y toma de muestras.....	19
7.2 Protocolo de siembra desde medio de transporte a medio sólido de cultivo bacteriano.....	20
7.3 Protocolo de aislamiento de colonias para cultivos puros.....	21
7.4 Análisis macroscópico de las colonias.....	22
7.5 Protocolo de preparación de frotis bacteriano a partir de placa de cultivo.....	22
7.6 Protocolo de tinción Gram del frotis.....	23
7.7 Análisis microscópico de las muestras.....	23
7.8 Test de susceptibilidad de antibióticos por difusión en agar (sensidiscos).....	24
7.9 Test de la Arabinosa para la diferenciación de especies del género <i>Enterococcus</i>	25

7.10	Preservación de muestras.....	26
7.11	Seguimiento de los pacientes con muestras representativas para la investigación.....	26
8.	Resultados.....	27
8.1	Grupo de estudio.....	27
8.2	Toma de muestras.....	31
8.3	Siembra de bacterias.....	32
8.4	Selección de bacterias.....	33
8.5	Tinción de Gram.....	35
8.6	Prueba de sensibilidad antibiótica.....	37
8.7	Prueba de identificación de especies para <i>Enterococcus spp</i> ...	40
8.8	Seguimiento de pacientes.....	42
9.	Discusión.....	44
10.	Conclusiones.....	52
11.	Sugerencias.....	53
12.	Bibliografía.....	54
13.	Anexos.....	58

Índice de Tablas

Tabla 1. Diagnóstico pulpar de las muestras y resultados de los cultivos.....	28
Tabla 2. Tinción de Gram y caracterización morfológica bacteriana.....	36
Tabla 3. Antibiograma.....	39

Índice de ilustraciones

Figura 1. Distribución porcentual de diagnósticos pulpares.....	30
Figura 2. Prevalencia de diagnósticos pulpares según sexo.....	30
Figura 3. Recolección de muestras.....	31
Figura 4. Medios de cultivo.....	32
Figura 5. Crecimiento de colonias en siembra bacteriana.....	33
Figura 6. Distribución porcentual de muestras según crecimiento en cultivos..	34
Figura 7. Tinción de Gram.....	35
Figura 8. Antibiograma.....	38
Figura 9. Test de la arabinosa.....	41
Figura 10. Relación porcentual Test de la arabinosa.....	41
Figura 11. Relación porcentual de los pacientes que realizaron y que no realizaron tratamiento endodóntico.....	42
Figura 12. Relación porcentual de los pacientes que realizaron y que no realizaron tratamiento endodóntico según sexo.....	43
Figura 13. Relación porcentual entre los fracasos en tratamiento endodóntico con la presencia de <i>Enterococcus spp</i>	43

1. Introducción

La pulpitis es la principal complicación de la caries dental, y por lo tanto representa un cuadro muy frecuente y por lo general, muy doloroso para el paciente que acude de urgencia a consulta. Para revertir esta afección, se realiza la remoción de la pupa infectada y, posteriormente, la desinfección de los canales radiculares para luego sellarlos de forma definitiva.

Pese a que el tratamiento endodóntico es en la mayoría de los casos exitoso y logra la mejoría del cuadro infeccioso de los pacientes, es muy común ver la recurrencia de ellos a la consulta dental por molestias o dolor persistente pese al tratamiento.

La persistencia de la infección es la causa principal del fracaso del tratamiento endodóntico, pues los microorganismos pueden permanecer dentro de los túbulos dentinarios, incluso a pesar de haber recibido medicación intraconducto.

Dentro del género bacteriano *Enterococcus* se distinguen 16 especies aisladas, que corresponden a cocáceas Gram-positivos presentados en parejas o en cadenas, que en años recientes, han atraído la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infección del sistema de conductos radiculares en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico.

Por su parte, las Enterobacteriáceas son una familia de bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos. Son especialmente resistentes a una gran gama de antibacterianos, por lo que estudios las consideran como bacterias “sobreinfectantes”, y en la cavidad oral se ha demostrado que exacerban las enfermedades.

En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo es “identificar la presencia de *Enterococcus spp.* y enterobacterias en pulpas dentales infectadas extraídas previo al procedimiento endodóntico y asociarlas a los fracasos en este tratamiento” con el fin de corroborar nuestra hipótesis que plantea que “existe una correlación entre la presencia de enterobacterias y *Enterococcus spp.* con cuadros clínicos de recurrencia post tratamiento endodóntico”.

Este corresponde a un estudio descriptivo, observacional, de corte transversal. Las muestras serán recolectadas de todos los pacientes con indicación de remoción pulpar con diagnóstico de “pulpitis irreversible” asociada a caries que acudan a Urgencias del Consultorio Cristo Vive y al servicio de Urgencias de la Universidad Andrés Bello. Las pulpas serán extraídas y llevadas al laboratorio para su análisis. A los pacientes participantes se les hará un seguimiento en un tiempo determinado que indicará si tuvieron o no la necesidad de volver a consulta por permanencia de la afección, para luego describir la correspondencia de este hecho con su muestra microbiológica y poder establecer alguna relación.

Los datos se recogerán mediante una ficha clínica que registrará la información necesaria para la investigación, más la firma del consentimiento informado. Se utilizarán planillas y tablas para el análisis estadístico de resultados.

2. Marco Teórico

La pulpa dental es el tejido conectivo laxo que se encuentra en el interior de los dientes; y está compuesto por nervios, vasos sanguíneos y células especializadas, entre otros. Su función principal es formar el diente y percibir estímulos externos.

Dado que la pulpa está contenida en una cavidad bien delimitada dentro del diente, en caso de presentar injuria o ante un estímulo nocivo, no tiene espacio para expandirse cuando se inflama y por ello aumenta la presión interna del diente dando lugar a un cuadro muy doloroso. Si una inflamación leve se trata adecuadamente, el diente no sufrirá un daño irreversible; sin embargo, una inflamación grave o mantenida en el tiempo podría dañar la pulpa de forma permanente. Se sabe que las infecciones endodónticas son la principal causa de dolor orofacial y pérdida de dientes en los países occidentales, y pueden conducir a graves infecciones que amenazan la vida (1).

La endodoncia es una parte de la odontología que se ocupa de la etiología, diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades de la pulpa y del periápice. El diagnóstico adecuado tiene una importancia fundamental y define la terapia a ser instituida. Las infecciones endodónticas son muy frecuentes, ya que representan la mayoría de las complicaciones de la caries dental y su tratamiento, así como también de los daños traumáticos dentales.

La pulpitis se define como un proceso inflamatorio que afecta a la pulpa del diente, como consecuencia de infecciones, traumatismos, iatrogenias, entre otros. Cuando este cuadro se presenta de intensidad leve a moderada y la pulpa es capaz de regresar al estado no inflamatorio después de retirado el estímulo se denomina pulpitis reversible.

Por su parte, la pulpitis irreversible es una enfermedad inflamatoria persistente de la pulpa, la cual se encuentra vital, pero sin capacidad de

recuperación, aun cuando se hayan eliminado los estímulos externos que provocan el estado inflamatorio. Generalmente son debidas a una pulpitis reversible no tratada. Se caracteriza también por la aparición de dolor de forma espontánea, sin haber aplicado ningún estímulo sobre el diente. Este cuadro deberá ser tratado siempre, ya que no se puede recuperar, bien haciendo una endodoncia o, si el diente es insalvable, una extracción.

La pulpa ofrece buenas condiciones para el crecimiento bacteriano por estar protegida de la respuesta inmune y de fenómenos de arrastre.

Se describen distintas vías de acceso a la pulpa por parte de los microorganismos (2), como por ejemplo, a través de una comunicación directa de la pulpa dentaria con la cavidad oral, ya sea por lesiones cariosas, fracturas dentales, grietas o fisuras del esmalte, maniobras operatorias, etc.

La causa más prevalente de infección de la pulpa dental es la comunicación con la dentina cariada a través de los túbulos dentinarios. Puede producirse infección directa por las bacterias, o daños por sus toxinas o metabolitos, que llegan a la pulpa. Además, las abrasiones, maniobras quirúrgicas o erosiones, ponen en contacto el medio oral con la pulpa, facilitando su infección.

Las enfermedades periodontales pueden destruir la inserción de los dientes. Si la pieza dentaria afectada tiene un conducto lateral, éste puede quedar en contacto con la cavidad oral, determinando una vía de acceso de microorganismos.

Las filtraciones marginales de las restauraciones en la zona que hay entre el material de restauración y el diente también determinan una vía de acceso. Éste espacio no debería existir, y si aparece, se debe a una mala técnica quirúrgica, errores en la obturación o desgaste del material restaurador, que también favorecerán la invasión microbiana.

Mediante la “anacoresis”, definida como el mecanismo mediante el cual las bacterias pueden colonizar e infectar la pulpa dental a través de la circulación sanguínea. Pero para que esto suceda, debe haber una inflamación pulpar que incapacite a los sistemas de inmunidad (2).

Según la vía de acceso que utilice la microbiota para causar la pulpitis, se va a determinar el tipo de microorganismos más prevalentes (2). La etiología de las infecciones endodónticas es heterogénea y es probable que sea polimicrobiana.

Dado que las Infecciones endodónticas tienen lugar en un sistema cerrado, estable y con un ambiente relativamente controlado, es que se presta para un adecuado muestreo y análisis. Sin embargo, investigaciones anteriores que han buscado analizar los patógenos microbianos más prevalentes en infecciones endodónticas han sido incompletas y no concluyentes. Los posibles motivos de esta falta de información sobre las asociaciones microbianas en infecciones endodónticas son múltiples y asociados a la gran cantidad de variables involucradas (1).

En los estudios y publicaciones más concluyentes, dentro de las especies bacterianas más aisladas se incluyen principalmente: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* (3).

El Género *Enterococcus* engloba un conjunto de especies morfológicamente semejantes a los estreptococos. Los enterococos se asocian en parejas y cadenas cortas, y poseen un gran número de factores de virulencia tales como polisacáridos capsulares, sitios de unión de la fibronectina, la presencia de hemolisinas o la agregación de sustancias, que se sugiere también podrían aumentar su patogenicidad. Esta familia bacteriana causa infecciones muy diversas y poseen un creciente interés en el caso de los procesos oportunistas

y si bien, su hábitat natural es el intestino, se han podido aislar a veces como microbiota normal en la mucosa bucal y dorso de la lengua. También se han descrito aislamientos de infecciones pulpares y periapicales. Son reconocidos como potenciales patógenos humanos causando 12% de las infecciones nosocomiales.

Enterococcus faecalis es el patógeno humano más frecuente representando el 60% al 90% de los aislamientos clínicos de enterococos, mientras que *E. faecium* es la segunda especie aislada en frecuencia, representando del 5% al 16% de los aislamientos clínicos ⁽⁴⁾.

Por otro lado, *Enterococos Faecalis* se ha encontrado de forma ocasional en los casos de infección primaria endodóntica. Sin embargo, en los casos de tratamientos endodónticos fallidos, *E. faecalis* se ha aislado con gran frecuencia ⁽⁴⁾.

Por su parte, las enterobacterias son una familia heterogénea y amplia de bacilos Gram negativos que residen en el colon del hombre sin causar enfermedad, aunque con frecuencia son causantes de un número considerable de infecciones. Estas pueden ser flora normal o transitoria en la cavidad bucal y en otras regiones húmedas de la piel.

En los últimos años un porcentaje cada vez mayor de estas bacterias se han hecho resistentes incluso a las cefalosporinas de tercera generación debido al desarrollo de Betalactamasas de espectro ampliado, además el desarrollo de resistencia a quinolonas es cada vez más preocupante y está relacionado con el consumo indiscriminado de estos antibióticos. Otro factor de virulencia en las enterobacterias es su capacidad de producir toxinas, que es una característica propia de las cepas patógenas de este grupo ⁽⁵⁾.

El espectro etiológico de las infecciones producidas por especies de enterobacterias es grande, siendo estos gérmenes los más frecuentes

implicados en las infecciones del tracto urinario (48%) y las infecciones de las heridas (27%).

La resistencia de *Enterobacter spp.* a betalactámicos es bastante alta, especialmente a las penicilinas (94,92%). Se postula que la selección de cepas resistentes a estos antibióticos es preocupante, y los resultados obtenidos sustentan la necesidad de implementar estrategias coherentes para el seguimiento de la aparición y propagación del fenómeno de la resistencia ⁽⁶⁾.

En un estudio sobre la resistencia antibiótica de distintas cepas bacterianas aisladas de canales radiculares infectados, los resultados obtenidos sugieren que en infecciones endodónticas, los canales radiculares sirven como un depósito microbiano para la resistencia a los antibióticos ⁽⁷⁾.

Es por todo lo recién mencionado, que se establece que estas bacterias, de presentarse en los conductos radiculares, podrían tener una asociación con los tratamientos de endodoncia fallidos, al ser consideradas resistentes al tratamiento ^{(5) (8)}.

Desde el punto de vista de los pacientes, un tratamiento endodóntico exitoso, consiste en la ausencia de síntomas y que la pieza dental tratada este estética y funcionalmente en su boca, sin embargo, la literatura propone evaluar el éxito del tratamiento mediante otros parámetros: sintomáticos, radiográficos e histológicos.

Por otro lado, el desarrollo de un proceso patológico apical posterior al tratamiento de conducto, está relacionado a factores diversos, que incluyen la falla del sellado apical, instrumentación apical deficiente y la presencia de microorganismos o sus productos microbianos por filtración o permanencia, lo que para algunos autores, sería el motivo principal ⁽⁹⁾.

La persistencia de la infección o la reinfección es la causa principal del fracaso de conductos obturados pues los microorganismos pueden permanecer dentro de los túbulos dentinarios, en lagunas del cemento radicular, en las foraminas apicales y en las lesiones periapicales. Incluso en muchas lesiones patológicas periapicales un gran número de microorganismos persisten a pesar de haber recibido medicación intraconducto ⁽¹⁰⁾ y a los efectos de la aplicación de los procedimientos biomecánicos que se realizan durante la ejecución de dicho tratamiento o, pueden haber invadido los conductos como consecuencia de las filtraciones que se suscitan en la corona de los dientes con tratamientos de conductos obturados.

Diversos estudios han revelado que la microbiota de los dientes con fallas en el tratamiento endodóntico, difieren de la microbiota encontrada normalmente en los conductos de dientes no tratados. La microbiota que se encuentra en los dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico es predominantemente anaerobia facultativa y Gram positiva ⁽⁹⁾.

Wang L. y cols. ⁽¹¹⁾ sugieren que hay una diferencia tanto cualitativa como cuantitativa entre las especies microbianas aisladas en infecciones endodónticas primarias y las infecciones en retratamientos endodónticos, siendo *E. faecalis* tres veces más frecuente en canales radiculares endodonciados (prevalencia 77%). Apoyando lo publicado años anteriores por Pinheiro y cols. ⁽¹²⁾, quienes informaron de que los géneros bacterianos más frecuentemente recuperados de dientes con fracaso endodóntico fueron *E. faecalis* (36,7%) seguido por *Peptostreptococcus spp.* (23,4%).

En base a todo lo anteriormente expuesto, el objetivo fundamental de esta investigación es evaluar si existe alguna relación entre la presencia de *Enterococcus spp.* y enterobacterias aisladas en muestras de pulpas trepanadas, con la recurrencia del paciente a la consulta dental por fracaso de su tratamiento endodóntico. Con esto, buscamos corroborar nuestra hipótesis que plantea que “existe una correlación entre la presencia de enterobacterias y *Enterococcus spp.* con cuadros clínicos de recurrencia post tratamiento endodóntico”.

Comprender la transición espacial de la microbiota de las cavidades orales normales a través del conducto radicular infectado podría mejorar nuestro conocimiento de la patogénesis de infecciones endodónticas y dar lugar a un tratamiento más eficaz ⁽¹⁾.

Una de la tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos.

Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso y para conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica, y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, un pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica lo constituye la asignación de especie a un aislamiento microbiano.

De manera rutinaria, el laboratorio de microbiología aplica técnicas fenotípicas que permiten lograr los objetivos expuestos. Estos métodos están consolidados en los laboratorios de microbiología y en la práctica rutinaria diaria, ya que tradicionalmente, las bacterias han sido estudiadas por técnicas de cultivo, que se basan en el aislamiento, el crecimiento e identificación de acuerdo con la morfología, pruebas bioquímicas o sistemas comerciales

multipruebas ⁽⁴⁾, también encontramos métodos de diferenciación molecular y proteómicos, los cuales permiten soslayar algunas limitaciones de los anteriores pese a que su implementación no es universal en todos los laboratorios. Este hecho se debe a un costo más elevado y al grado de especialización que se requiere para su aplicación, por lo que los métodos moleculares y proteómicos suelen estar centralizados en laboratorios especializados o centros de referencia ⁽¹³⁾.

Existen medios de cultivos específicos y diferenciales, que permiten identificar microorganismos según sus requerimientos nutricionales.

El Agar Bilis Esculina, se usa para aislar e identificar un gran número de miembros del género *Enterococcus* y algunos *Streptococcus* del grupo D. Su ingrediente selectivo son las sales biliares, mientras que la esculina es un componente diferencial. Los *Enterococcus* hidrolizan la esculina en subproductos que reaccionan con el citrato férrico que contiene el medio, produciendo sales de hierro que resultan en un ennegrecimiento del medio.

Por su parte, el Agar Mc Conckey, es un medio de cultivo específico para bacterias Gram negativas y cepas que fermentan la lactosa. Al utilizar la lactosa en el medio, bacterias Lac + como *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella* producen acidez, lo cual baja el PH bajo 6,8, lo que tiene como consecuencia la aparición de colonias rosadas o rojas.

El Agar Nutritivo, es un medio de cultivo usado normalmente de rutina para todo tipo de bacterias, con propósitos generales.

El estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de las diferentes bacterias aisladas en muestras biológicas tiene 2 objetivos fundamentales: guiar al clínico en la elección del mejor tratamiento individual, y monitorizar la evolución de la resistencia bacteriana con objeto de revisar el espectro del antimicrobiano y

poder actualizar los tratamientos empíricos. Este estudio se realiza mediante el antibiograma, que mide la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos in vitro y a partir de estos resultados predice la eficacia in vivo.

3. Hipótesis

En base a los antecedentes expuestos, en este trabajo se postula que *existe una correlación entre la presencia de enterobacterias y Enterococcus spp. con cuadros clínicos de recurrencia post tratamiento endodóntico.*

Esta hipótesis de investigación será sometida a confirmación experimental.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar una posible relación entre la presencia de *Enterococcus spp.* y enterobacterias aisladas en muestras de pulpas trepanadas, con la recurrencia del paciente a la consulta dental por fracaso de su tratamiento endodóntico.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar enterobacterias en pulpas dentales extraídas por indicación de endodoncia.
2. Identificar *Enterococcus spp.* en pulpas dentales extraídas por indicación de endodoncia.
3. Establecer una relación entre aquellos pacientes que recurren a la consulta dental por fracaso del tratamiento endodóntico con aquellos que presentan en sus muestras la presencia de enterobacterias.
4. Establecer una relación entre aquellos pacientes que recurren a la consulta dental por fracaso del tratamiento endodóntico con aquellos que presentaban en sus muestras la presencia de *Enterococcus spp.*

5. Metodología de estudio

Tipo de investigación: Clínica y de laboratorio

Tipo de estudio: Descriptivo, observacional de cohorte trasversal.

Población objetivo: Aquellos pacientes que acudan al Consultorio Cristo Vive de Recoleta y a Urgencias de la Universidad Andrés Bello, los cuales tengan indicación de trepanación de alguna pieza dental (por tratamiento de endodoncia o por urgencia).

Criterios de inclusión:

- Paciente que asista al Consultorio Cristo Vive de la comuna de Recoleta.
- Paciente que asista a Urgencias de la Universidad Andrés Bello.
- Paciente de cualquier género.
- Paciente de cualquier edad.
- Paciente que presente el cuadro clínico de cualquier tipo de pulpitis irreversible o necrosis pulpar (que incluya o no lesión periapical), cuya indicación terapéutica es trepanación de la pieza afectada.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que presenten un cuadro clínico diferente a pulpitis irreversible o necrosis pulpar, cuya indicación terapéutica sea distinta a la extracción pulpar.
- Paciente que no esté de acuerdo en participar con el estudio o se rehúse a firmar el consentimiento informado.

Variables a estudiar:

- *Variables de resultado:* Presencia de microorganismos y especies bacterianas. Resistencia antimicrobiana de los encontrados.
- *Variables de control:* Género femenino y masculino.

Diseño muestral:

Basado en un muestreo no probabilístico, en donde los sujetos serán seleccionados por conveniencia, ya que se considerarán todos los pacientes que se presenten en el Consultorio Cristo Vive de Recoleta o en Urgencias de la Universidad Andrés Bello, que tengan la indicación terapéutica de trepanación dentaria. Se tabularán aquellos que cumplan con los criterios de inclusión establecidos.

Técnica de recolección de información:

Todos los pacientes a quienes se les indique extirpar la pulpa dentaria por presentar cuadros clínicos de pulpitis irreversibles o necrosis pulpar (el examen clínico confirmará el diagnóstico).

Se tomarán los datos personales de los pacientes y se les indicará que una vez que se realicen el tratamiento endodóntico correspondiente, nos contactaremos con ellos nuevamente para un leve cuestionario (indicativo de éxito o no del tratamiento)

El grupo de sujetos deberán firmar un consentimiento informado donde aceptarán ser parte del estudio para poder iniciar la toma de muestras.

La muestra será analizada en el Laboratorio de Microbiología de la Clínica Odontológica de la Universidad Andrés Bello.

Una vez realizados los procedimientos, se analizarán los resultados y correlacionarán con los datos aportados por los pacientes para informar las conclusiones finales de la investigación.

6. Materiales

6.1 Insumos Odontológicos:

- Extractores pulpares de distintos calibres
- Gomas dique e instrumental de aislación
- Guantes

6.2 Insumos de laboratorio:

- Tubos de microfuga (Eppendorf)
- Medio de transporte Tioglicolato
- Placas de Petri
- Botellas de vidrio estéril
- Asa bacteriológica de platino
- Agar de cultivo MacConkey (HiMedia)
- Agar de cultivo Bilis-Esculina (HiMedia)
- Agar de cultivo Muller-Hinton (Merck) con sangre
- Cotonitos estériles
- Tubos de ensayo
- Suero fisiológico estéril
- Película autosellante (Parafilm)

- Gradilla
- Insumos de tinción Gram: cristal violeta, lugol, solución alcohol-acetona, fucsina.
- Sensidiscos de antibióticos (Amoxicilina, Amoxicilina y Ácido Clavulánico, Vancomicina, Clindamicina, Azitromicina, Cefradina)
- Arabinosa (reactivo)
- Caldo de infusión cerebro/corazón (BHI)
- Púrpura de bromocresol (indicador de PH).

7. Métodos

7.1 Protocolo de selección del paciente, consentimiento informado y toma de muestra

A cada paciente que acudió al Consultorio Cristo Vive, seleccionado según diagnóstico dental para participar en el estudio, se le sometió al siguiente protocolo:

- i. Explicación sobre en qué consiste el trabajo de investigación a realizar.
- ii. Firmar el consentimiento informado, manifestando su acuerdo en participar.
- iii. Responder a las distintas preguntas de la historia clínica diseñada para el estudio.
- iv. Toma de muestras: El profesional tratante realiza el procedimiento correspondiente sin alterar su metodología, en donde rutinariamente, se anestesia al paciente, se aísla el diente de manera absoluta, es decir, con goma dique para luego abrir cavidad de acceso (obteniendo paso directo a la cavidad pulpar) con fresas corrientes de alta o baja velocidad. Al momento de comunicar con la pulpa, se introduce en ella un extractor pupar estéril y de calibre específico para el diente a tratar, con la precaución de que éste no contacte con nada en su trayecto del envase al diente en el momento de ser introducido. Una vez que ejerce resistencia dentro de los conductos radiculares, el extractor es retirado e inmediatamente sumergido en el medio de transporte Tioglicolato. El odontólogo tratante prosigue con el tratamiento, mientras que el tubo con la muestra es inmediatamente puesto en un contenedor a 3 °C, y

manteniendo la cadena de frío es transportado al Laboratorio de Microbiología.

v. Al llegar al laboratorio se procedió a realizar la siembra de la muestra en 3 tipos de cultivos, primero en Agar MacConkey, segundo en Agar Bilis Esculina y por último en Agar Nutritivo.

7.2 Protocolo de siembra desde medios de transporte a medios sólidos de cultivo bacteriano

i. Desde los tubos de medio de transporte con los extractores pulpaes con la muestra de pulpa, se sembraron los microorganismos en placas de Petri con Agar MacConkey, Agar Bilis Esculina y Agar Nutritivo. Todo este proceso tuvo una serie de subfases:

ii. Se rotuló cada una de las placas con el número de la muestra y fecha de la siembra.

iii. Se destapó el tubo de microfuga con el medio de transporte y los extractores pulpaes.

iv. Se tomó la placa por su base y se realizó la siembra mediante estrías y para ello se deslizaron suavemente los extractores pulpaes con la muestra en forma de zig-zag en un pequeño sector de la placa, con extrema precaución de no desgarrar el medio de cultivo.

v. Con el asa estéril, se deslizó desde el sector ya sembrado hacia el sector contrario de la placa nuevamente en forma de zig-zag. Se flameo el asa, para eliminar las bacterias.

vi. Con el asa estéril, a partir de las últimas líneas realizadas, se debió deslizar hacia el sector contrario de la placa en forma de zig-zag. Nuevamente se flameo el asa.

- vii. Con el asa estéril, se debió repetir el procedimiento hasta completar la placa. Se tuvo cuidado de que cuando se realizaran las estrías no se tocaran las que ya se encontraban en la placa.
- viii. Se tapó la placa y se flameo el asa para su esterilización.
- ix. Las Placas con Agar MacConkey, Agar Bilis Esculina y Agar Nutritivo se incubaron a 37 °C durante 24 horas.
- x. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se sacaron las placas de la estufa.

7.3 Protocolo de aislamiento de colonias para cultivos puros.

- i. Luego del protocolo anterior, se seleccionaron las colonias que crecieron en mayor cantidad y de forma más selectiva en los cultivos.
- ii. Se resembró cada colonia nueva seleccionada en una nueva placa de Agar MacConkey, Agar Bilis Esculina y Agar Nutritivo según correspondiera.
- iii. Con el asa estéril, se tomó la colonia seleccionada desde la placa en que creció.
- iv. Se tomó la placa por su base y se realizó la siembra mediante estrías y se deslizó el asa con la colonia, en forma de zig – zag, en un pequeño sector de la placa.
- v. Con el asa estéril, se deslizó nuevamente, desde el sector ya sembrado hacia el sector contrario de la placa en forma de zig – zag. Se flameo el asa.

- vi. Con el asa estéril, a partir de las últimas líneas realizadas, se deslizó hacia el sector contrario de la placa en forma de zig-zag. Nuevamente se flameo el asa.
- vii. Con el asa estéril, se repitió el procedimiento hasta completar la placa.
- viii. Se tapó la placa y se flameo el asa para su esterilización.
- ix. Se rotuló cada nueva placa con los datos.
- x. Se incubó la placa a la temperatura adecuada de 37 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo fueron retiradas de la estufa.

7.4 Análisis macroscópico de las colonias

Se observaron y describieron las colonias bacterianas de acuerdo a criterios macroscópicos: tamaño, forma, elevación, margen, color, superficie, densidad y consistencia.

En este procedimiento, se seleccionaron las muestras que cumplían con las características macroscópicas de las colonias de *Enterococcus* y enterobacterias.

7.5 Análisis microscópico de las colonias:

Protocolo de preparación frotis bacteriano a partir de placa con cultivo:

- i. Se flameo el asa para su esterilización.
- ii. Se enfrió el asa en las paredes internas de la placa de Petri con el cultivo.

- iii. Se tomó una colonia de la placa seleccionada.
- iv. Se colocó una gota de agua en la superficie del portaobjeto.
- v. Se resuspendió la colonia en la gota de agua hasta disolverla.
- vi. Se fijó el frotis, exponiéndolo suavemente a la llama del mechero hasta que se secara.

7.6 Protocolo de tinción de Gram del frotis

- i. Se cubrió el frotis completamente con cristal violeta y se incubó por 3 minutos.
- ii. Se dejó escurrir el cristal violeta y se agregó sobre la muestra una solución de Lugol. Se incubó por 2 minutos.
- iii. Se lavó el Lugol, alternando agua y alcohol-acetona, dejándolo escurrir, y siempre terminando con agua, hasta que se eliminara el exceso de cristal violeta o se decolorara completamente la muestra fijada.
- iv. Se cubrió con colorante de contraste Safranina al 1% por 1 minuto.
- vi. Se lavó con agua, se dejó escurrir y se secó suavemente con papel absorbente.

7.7 Análisis microscópico de las muestras

Se observó en el Microscopio Óptico con aceite de inmersión (Lente Objetivo 100X).

Se observaron bacterias con tinciones diferenciales, ya que por su estructura física y composición química, reaccionarán en forma diferente frente a los colorantes. Además se observa forma, agrupación y color, permitiendo así diferenciar los distintos grupos de bacterias.

7.8 Test de susceptibilidad de antibióticos por difusión en agar (sensidiscos)

- i. Esta prueba se realizó sobre céspedes de las bacterias obtenidas en este trabajo, en placas con medios Mueller Hinton para enterobacterias y Mueller Hinton suplementado con sangre para *Enterococcus* (requerimiento nutricional).
- ii. Con el Asa bacteriológica de platino se tomaron colonias desde la placa y se llevaron a un tubo de ensayo con agua destilada estéril hasta lograr una turbidez McFarland de estándar 0,5.
- iii. Se tomó un cotonito estéril y se sumergió en el caldo recién inoculado. Se flameó la boca del tubo y se cerró.
- iv. Con el cotonito impregnado en el caldo se deslizó sobre toda la superficie del agar Mueller Hinton y Mueller Hinton Sangre, realizando una siembra en césped.
- v. Con una pinza estéril, previamente flameada en el mechero, se procedió a tomar con mucho cuidado cada sensidisco y a distribuirlos homogéneamente en la placa.
- vi. Cada sensidisco se posicionó en la placa cuidando de no tocar el agar, se dejaron caer en la zona elegida y se presionó suavemente contra el agar con la pinza estéril.

vii. Se utilizaron sensidiscos de 6,5 mm de diámetro de los siguientes antibióticos o mezclas de ellos: Amoxicilina, Amoxicilina con ácido Clavulánico, Clindamicina, Azitromicina, Vancomicina y Cefradina (solo para antibiograma de Enterobacterias)

viii. Se observaron los halos de inhibición y se midieron los diámetros para determinar si la bacteria presenta un fenotipo susceptible, intermedio o resistente al antibiótico de cada sensidisco.

Tipos de halos que pueden desarrollarse alrededor de los sensidiscos:

- Resistente: no hay halo de inhibición o si existe es muy estrecho.
- Intermedio: hay un halo estrecho libre de crecimiento bacteriano alrededor del sensidisco.
- Sensible: hay un halo amplio libre de crecimiento bacteriano alrededor del sensidisco.

Para determinar la sensibilidad de la bacteria a un antibiótico, se debe medir el diámetro del halo de inhibición producido por el antibiótico y compararlo con las tablas estandarizadas por bacteria y antibiótico específico. En este caso, se utilizó la tabla proporcionada por Emarin SDA S.A. (marca sensidiscos utilizados).

7.9 Test de la Arabinosa para la diferenciación de especies del género *Enterococcus*

i. El reactivo del Test de la Arabinosa se preparó usando 1 g de l-arabinosa disuelta en 100ml de caldo de infusión cerebro/corazón (BHI), al cual se le añade el indicador púrpura de bromocresol al 0,006%. Se autoclava a 121° durante 10 minutos.

- ii. Una vez preparado el reactivo para el test, se deja enfriar a T° ambiente.
- iii. Se agregan 0,5ml del reactivo en tubos transparentes (10 tubos para las 10 muestras), al cual se agregan unas 4 o 5 colonias frescas del microorganismo en estudio.
- iv. Los tubos se incuban a 37° durante 4 horas. Un cambio de color de púrpura a amarillo es considerado positivo para la arabinosa.

7.10 Preservación de muestras

Los tubos de microfuga (Eppendorf) con Tioglicolato, que contenían cada una de las muestras en su interior, fueron rotulados con el número de muestra correspondiente a cada paciente, y puestos en refrigeración 5 °C.

7.11 Seguimiento de los pacientes con muestras representativas para la investigación

Transcurrido un periodo de tiempo de aproximadamente 5 a 8 semanas, una vez realizado las siembras de muestras en el laboratorio y concluida la parte experimental, se contactó vía telefónica o presencial a todos aquellos pacientes que aportaron con muestras para nuestro estudio, a los cuales se les realizó un leve cuestionario con el fin de saber el curso que tuvo la pieza dentaria luego del procedimiento de trepanación: si se le realizó la endodoncia correspondiente, y si ese tratamiento fue o no exitoso.

8. Resultados

8.1 Grupo de estudio

De un total de 56 pacientes de ambos sexos que asistieron al Consultorio Cristo Vive de la comuna de Recoleta y a la atención de Urgencias de la Universidad Andrés Bello, a los cuales se les extirpó la pulpa dental como indicación terapéutica, se recolectaron 60 muestras mediante extractores pupares estériles individuales para cada pieza dental afectada (cuatro de los pacientes aportaron con más de una muestra por tener más de una pieza dentaria afectada).

Los datos recolectados en la historia clínica fueron, además de los datos personales y de contacto, el diagnóstico dental para cada pieza a trepanar según sintomatología y examen clínico odontológico. Determinando como *PULPITIS* a la sintomatología positiva y percusión negativa; y como *NECROSIS PULPAR* a la sintomatología negativa y percusión positiva. Este último diagnóstico más bien hace referencia a una afectación periapical, pero sin embargo, para este trabajo, consideraremos que una lesión periodontal incluye de antemano la afectación pulpar completa.

Del total de muestras, 36 correspondieron a *pulpitis*, caracterizado por una sintomatología aguda, que acudieron en su mayoría en situación de urgencias. Las 24 muestras restantes presentaron sintomatología negativa a los test de sensibilidad, determinando una *necrosis* pulpar y en mucha menor medida acudieron por dolor (principalmente a la masticación) (Figura1).

Se hace una distinción por sexos para establecer una relación con la prevalencia de afectaciones pulpares y con la prevalencia de microorganismos encontrados. Se obtuvo que en el caso de *pulpitis*, acudieron 23 mujeres, versus 13 hombres. En el caso de *necrosis*, el sexo femenino también predomina por sobre el masculino con 16 casos sobre 8. (Figura 2).

Tabla 1: Diagnóstico pulpar de las muestras y resultado de los cultivos.

Paciente	Sexo	Diagnostico Pulpar	Cultivo Agar Bilis-Esculina	Cultivo Agar MacConkey	Cultivo Agar Nutritivo
N°1	M	NECROSIS	-	-	-
N°2	F	PULPITIS	-	-	-
N°3	M	PULPITIS	-	-	-
N°4	M	NECROSIS	-	-	-
N°5	F	NECROSIS	-	-	-
N°6	F	NECROSIS	-	-	-
N°7	F	NECROSIS	-	-	-
N°8	M	NECROSIS	-	-	-
N°9	F	NECROSIS	-	-	-
N°10	F	NECROSIS	-	-	-
N°11	M	NECROSIS	+	-	-
N°12	F	PULPITIS	-	-	-
N°13	F	NECROSIS	-	-	-
N°14	M	NECROSIS	+	-	-
N°15	F	PULPITIS	-	-	-
N°16	F	PULPITIS	-	-	-
N°17	F	PULPITIS	-	-	-
N°18	F	NECROSIS	+	-	-
N°19	F	PULPITIS	-	-	-
N°20	M	PULPITIS	-	-	-
N°21	M	PULPITIS	+	-	-
N°22	F	NECROSIS	+	-	-
N°23	F	PULPITIS	-	-	-
N°24	F	PULPITIS	-	-	-
N°25	F	PULPITIS	-	-	-
N°26	F	PULPITIS	-	-	-
N°27	M	PULPITIS	-	-	-
N°28	F	PULPITIS	+	-	-
N°29	F	NECROSIS	-	-	-
N°30	F	PULPITIS	+	-	-
N°31	M	PULPITIS	+	-	-
N°32	M	PULPITIS	-	-	-
N°33	F	PULPITIS	-	-	-
N°34	F	NECROSIS	+	-	-
N°35	F	PULPITIS	+	-	-

N°36	M	NECROSIS	+	-	-
N°37	F	PULPITIS	-	-	-
N°38	F	PULPITIS	-	-	-
N°39	F	PULPITIS	-	-	-
N°40	M	PULPITIS	+	+	-
N°41	F	NECROSIS	+	-	-
N°42	F	NECROSIS	+	-	-
N°43	M	NECROSIS	+	-	-
N°44	M	PULPITIS	-	-	-
N°45	F	PULPITIS	-	-	-
N°46	F	NECROSIS	+	-	-
N°47	F	PULPITIS	+	-	-
N°48	F	PULPITIS	-	-	-
N°49	M	PULPITIS	-	-	-
N°50	M	NECROSIS	-	-	-
N°51	F	PULPITIS	-	-	-
N°52	M	PULPITIS	-	-	-
N°53	F	PULPITIS	-	-	-
N°54	F	NECROSIS	+	+	-
N°55	M	PULPITIS	-	-	-
N°56	F	PULPITIS	-	-	-
N°57	F	NECROSIS	-	-	-
N°58	F	NECROSIS	-	-	-
N°59	M	PULPITIS	-	-	-
N°60	M	PULPITIS	-	-	-

* F: Sexo femenino; M: Sexo masculino; (+): presentó crecimiento; (-): sin crecimiento.

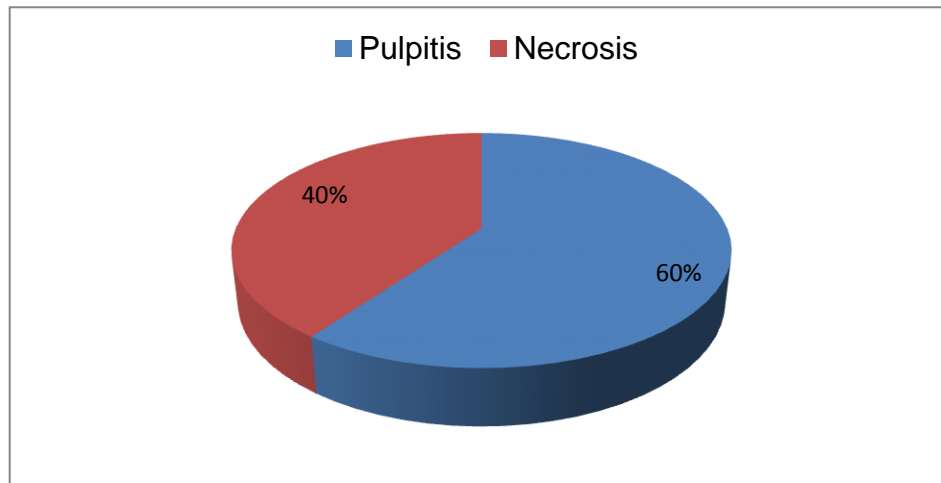


Figura 1. Distribución porcentual de los diagnósticos pulpaes.

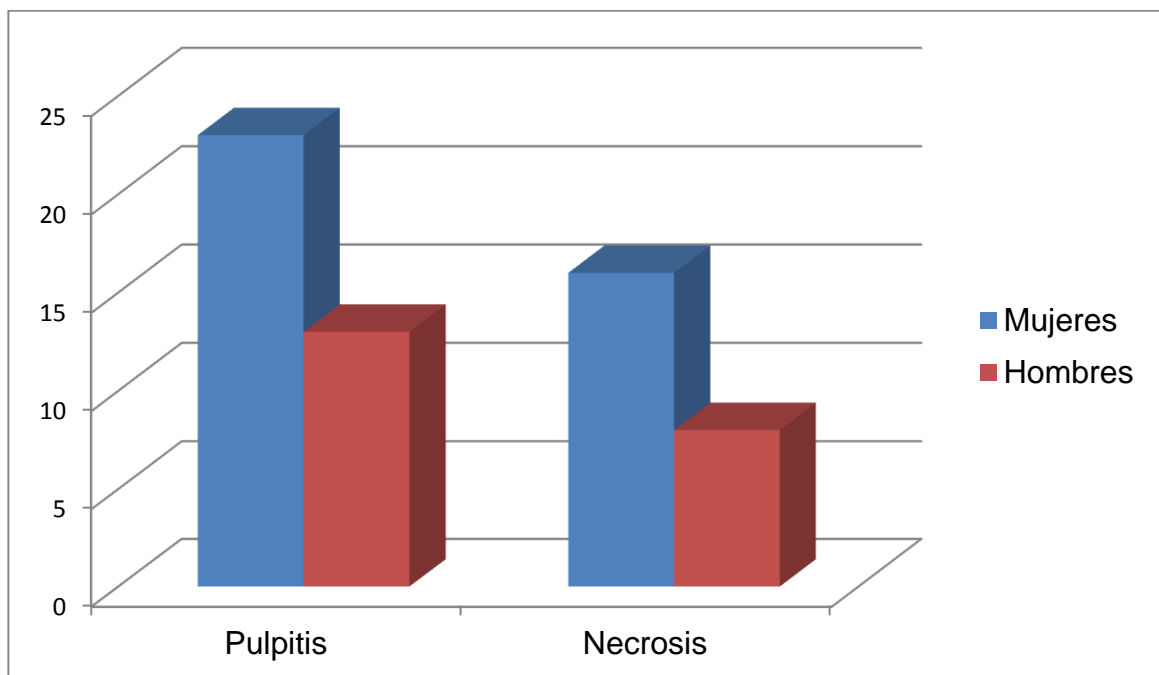


Figura 2. Prevalencia de diagnósticos pulpaes según sexo.

8.2 Toma de muestras:

La toma de muestras se llevó a cabo durante el procedimiento de trepanación pulpar, en donde para extirpar la pulpa dental se utilizan extractores pulpares estériles desechables, los cuales fueron recolectados inmediatamente luego de cumplir su función en el medio de transporte de Tioglicolato para ser llevados al laboratorio de Microbiología Oral, manteniendo la cadena de frío (transportados en recipientes especiales). Este procedimiento se llevó a cabo bajo aislamiento absoluto de la pieza dental con goma dique y en un solo movimiento (del diente al medio), sin tocar ninguna otra superficie.

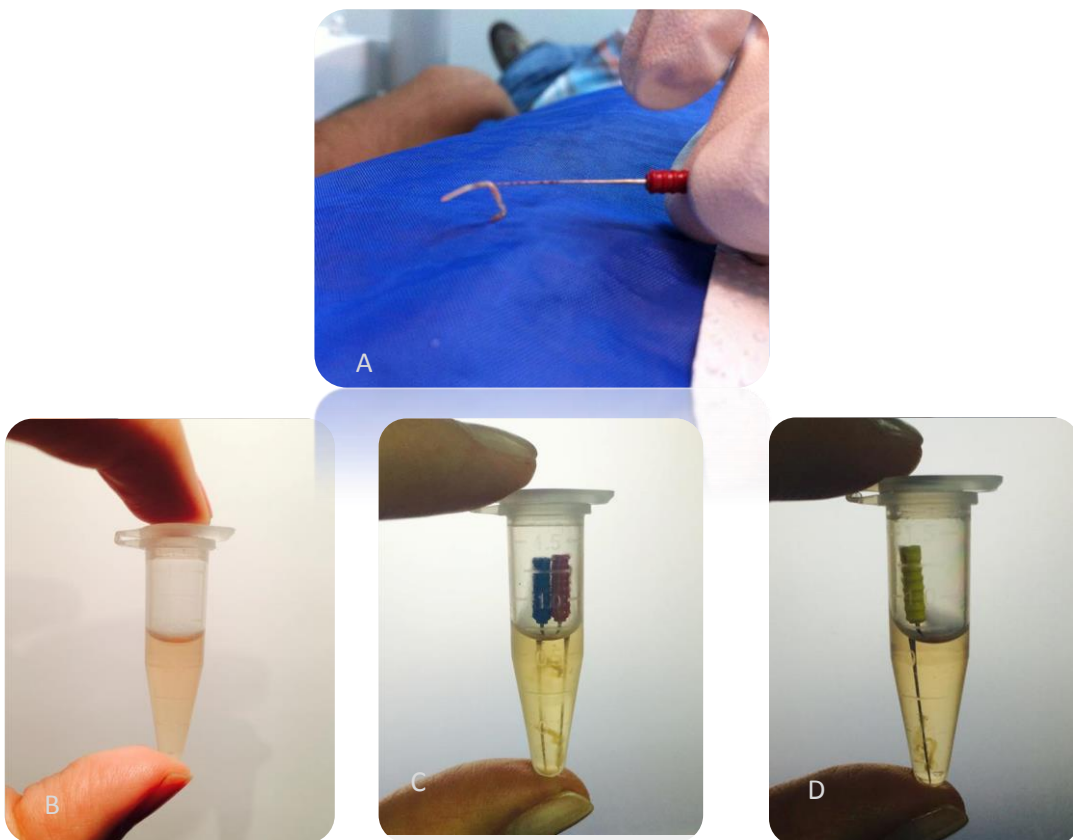


Figura 3. Recolección de muestras

A. Muestra biológica y extractor pulpar estéril.

B. Tubo de microfuga, contenedor de medio de transporte Tioglicolato.

C y D .Muestras pulpares contenidas en medio de transporte.

8.3 Siembra de bacterias

La identificación bacteriana comienza con el estudio de la morfología macroscópica y microscópica a partir de un cultivo puro.

La siembra de las bacterias se realizó desde los extractores pulpaes embebidos en el medio de transporte Tioglicolato a las placas de Petri con los distintos medios de cultivo sólidos.

Los extractores se pasaban linealmente en un sector de la placa de Petri, para luego, con el asa bacteriológica de platino realizar una siembra estriada en el resto de placa. Se sembró simultáneamente en el medio MacConkey, Bilis-Esculina y Agar Nutrición.

El tiempo de incubación de cada placa fue de 24 a 48 horas para cada medio. Esto es determinado por los microorganismos que crecerán en las placas.

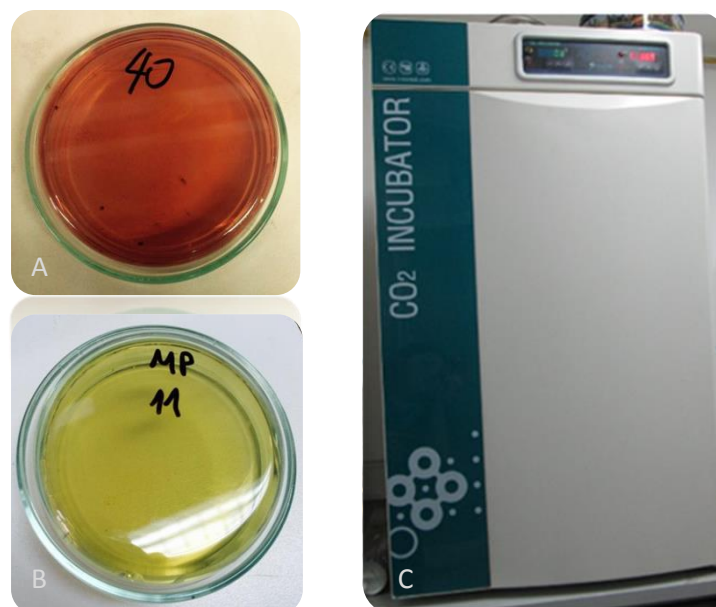


Figura 4. A- Medio de cultivo Agar MacConkey; B-Medio de cultivo Agar Bilis Esculina
C- Encubadora.

8.4 Selección de bacterias

Luego del periodo de incubación, se excluyeron aquellas muestras que no presentaron crecimiento o que presentaron colonias con características macroscópicas no esperadas (Tabla1).

En general, las especies de *Enterococcus* presentan colonias incoloras o grises en agar Bilis-Esculina ennegrecido, y enterobacterias presentan colonias rosadas a grises en el agar MacConkey, que cambia de color según la fermentación o no de lactosa por parte del microorganismo.

Para una selección microscópica e identificación morfológica bacteriana se utilizó la Tinción de Gram, cuya tinción diferencial divide a bacterias de tipo Gram negativo o positivo según afinidad a los colorantes (Tabla 2).

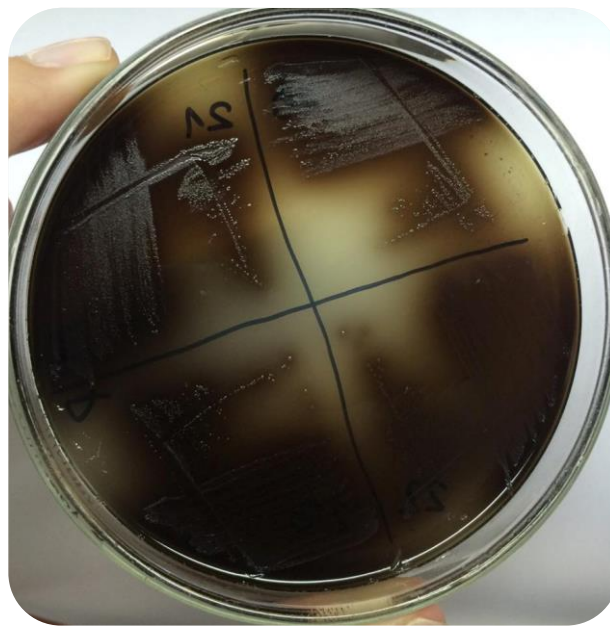


Figura 5. Crecimiento de colonias en siembra bacteriana por cuadrantes.

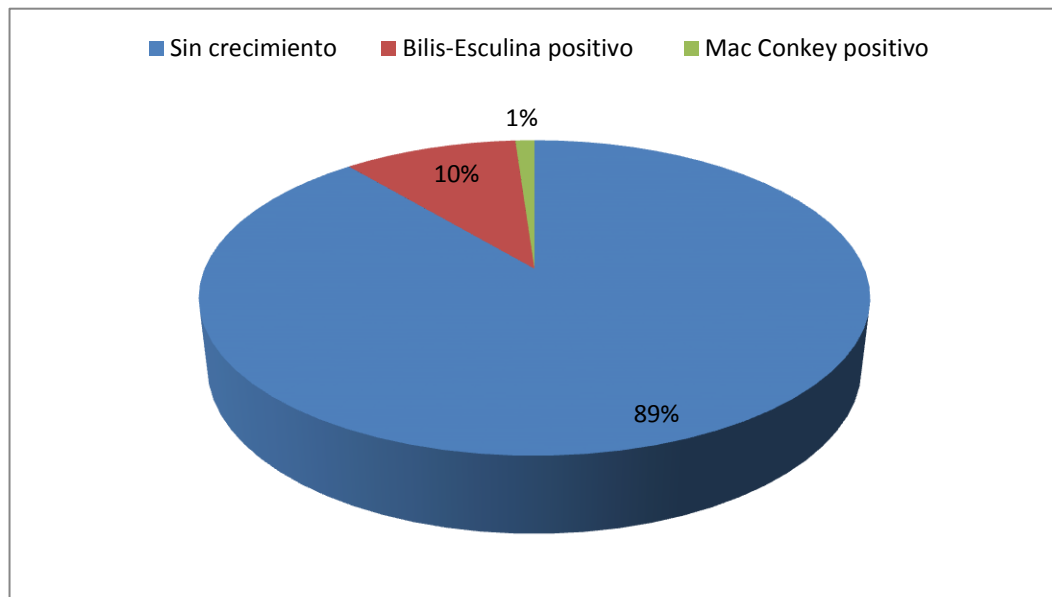


Figura 6. Distribución porcentual de muestras según crecimiento bacteriano en cultivos: Para un total de 180 placas de Petri sembradas, un 10% de ellas resultaron positivas para el Agar Bilis-Esculina y 1,1% positiva para el Agar MacConkey. No hubo crecimiento en las placas de Agar Nutrición, por lo que un 88,8% del total de placas no presentó resultados.

8.5 Tinción Gram

De las muestras seleccionadas, se realizó tinción de Gram para la identificación de la morfología bacteriana y si clasifican como Gram positivo o negativo.

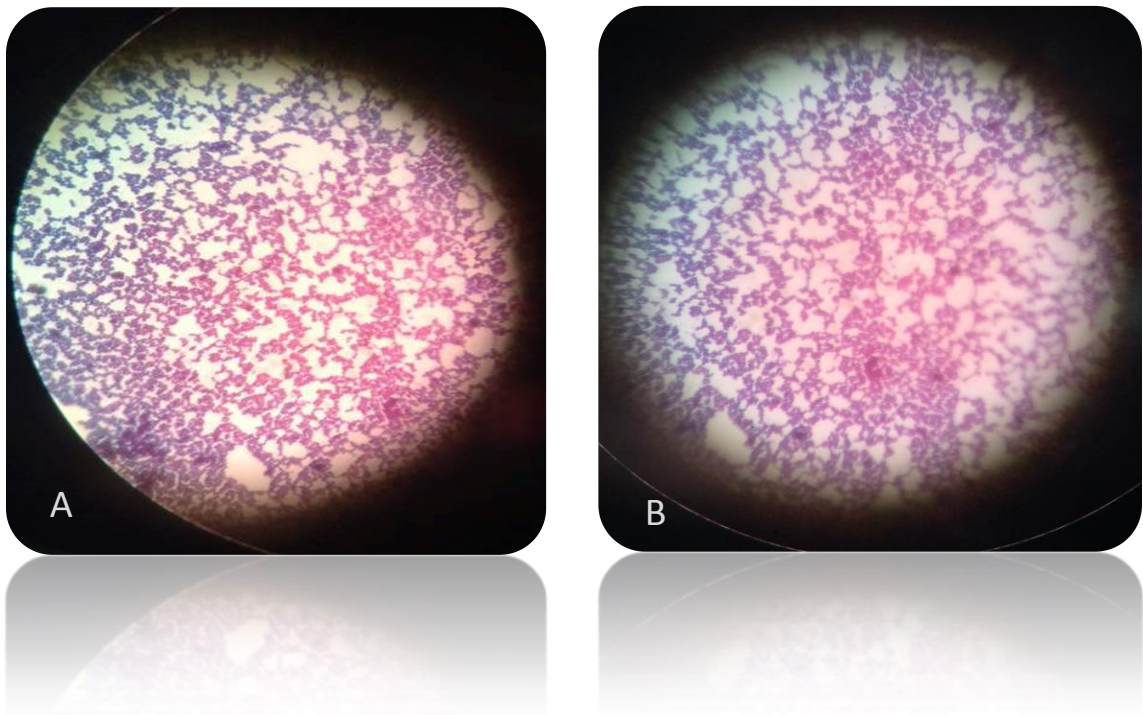


Figura 7. Tinción de Gram de una muestra.

Ilustración A y B muestran un ejemplo del resultado de la tinción de Gram de un frotis con una colonia bacteriana. Se observan cocáceas en grupos y cadenas Gram positivas. La observación directa se realizó con aceite de inmersión y aumento de 100X.

Tabla 2. Tinción de Gram y caracterización morfológica bacteriana.

Muestra	Tinción Gram	Características morfológicas
N° 11 BE	-	Cocos y bacilos en cadenas
N° 18 BE	+	Cocos en grupos
N° 21 BE	+	Cocos en cadenas
N° 22 BE	+	Cocos y cocobacilos en grupos
N° 28 BE	+	Cocos en grupos
N° 30 BE	+	Cocos en grupos y cadenas
N° 31 BE	+	Cocos en grupos
N° 35 BE	+	Cocos en grupos
N° 36 BE	-	Bacilos y cocos en grupos
N° 40 BE	-	Cocos en grupos y cadenas
N° 40 MC	-	Levaduras - Cocos aislados
N° 41 BE	+	Cocos en grupo
N° 42 BE	+	Cocos en grupo y cadenas
N° 46 BE	+	Cocos en grupo y cadenas

8.6 Pruebas de sensibilidad antibiótica

El criterio que se utilizó para seleccionar los antibióticos a utilizar, estuvo basado en la bibliografía que seleccionó los más comúnmente utilizados en tratamientos endodónticos de todo tipo.

Los endodoncistas usualmente utilizan en sus tratamientos Amoxicilina, Amoxicilina con Ácido Clavulánico, Clindamicina, Azitromicina y Vancomicina, que en este caso será nuestro control negativo para las especies de *Enterococcus* por su resistencia a esta ya conocida. Por su parte, para el antibiograma de Enterobacterias (Muestra N°40) se agregará Cefradina, cefalosporina de primera generación.

La prueba de los sensidiscos se llevó a cabo en placas de Petri con agar MuellerHinton (enterobacterias) y MuellerHinton Sangre (*Enterococcus*). Sobre estos medios, se realizó una siembra en césped de las bacterias previamente diluidas cada una en 1ml de suero estéril. Posterior a esto se dispusieron sobre estas placas los sensidiscos seleccionados y se procedió a incubar las placas por 24-48 hrs. a 37°C. Posterior a la incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición generados por los distintos antibióticos en cada una de la muestras, para luego interpretar los resultados según una tabla estándar (Emarin SDA S.A.).



Figura 8. Antibigrama: En la figura se muestra el ejemplo del antibiograma de una de las muestras.

Los sensidiscos con antibióticos se disponen de forma ordenada y separados entre ellos sobre la siembra en la placa de Petri, Se observan los distintos halos de inhibición determinados para cada uno.

Tabla 3. Resultados Antibiógrama

MUESTRA	ANTIBIOTICOS UTILIZADOS					
	Am	Am-Cl	Az	Va	Cl	Ce
18	S (40mm)	S (44mm)	S (39mm)	R --	R (12mm)	--
21	S (38mm)	S (42mm)	S (45mm)	R --	R (6mm)	--
22	S (36mm)	S (43mm)	S (44mm)	R --	R (14mm)	--
28	S (32mm)	S (35mm)	S (37mm)	R --	R (13mm)	--
30	S (43mm)	S (42mm)	S (46mm)	R --	S (24mm)	--
31	S (25mm)	S (29mm)	R (9mm)	I (13mm)	R --	--
35	S (30mm)	S (40mm)	S (20mm)	R --	R --	--
40	--	--	--	--	--	--
41	S (35mm)	S (34mm)	R (13mm)	S (21mm)	R --	--
42	S (35mm)	S (38mm)	S (40mm)	R --	R --	--
46	S (33mm)	S (35mm)	R (13mm)	S (19mm)	R --	--

* Abreviaturas: Am, Amoxicilina; Am-Cl, Amoxicilina-Ac.Clavulánico; Az, Azitromicina; Va, Vancomicina; Cl, Clindamicina; Ce, Cefradina. En paréntesis se indica el diámetro en milímetros del halo de inhibición de crecimiento para algunos ensayos. La Cefradina fue incluida solamente en el antibiógrama de la siembra de la muestra N°40. S=Sensible, R=Resistente, I=Sensibilidad Intermedia.

8.7 Prueba de identificación de especies bacteriana para el género *Enterococcus*

Dentro de este género bacteriano, la especie de *Enterococcus faecalis* es el patógeno humano más frecuente, representando el 60% al 90% de los aislamientos clínicos de enterococos, mientras que *E. faecium* es la segunda especie aislada en frecuencia.

Se realizó un test bioquímico diferencial entre especies de las muestras de *Enterococcus* obtenidas. El test de la arabinosa basado en la fermentación de este reactivo, diferencia las especies de *Enterococcus faecalis* de *Enterococcus faecium* mediante el viraje de PH que se establece en el medio. Un cambio de color de púrpura a amarillo se considera positivo para la arabinosa.

Para la prueba de la arabinosa, se agregaron colonias frescas de cultivos puros de *Enterococcus* en tubos con 0,5ml de reactivo. Se incubó a 37° durante 24 horas y se observó.

De las 10 muestras, 3 de ellas presentaron cambio de coloración de púrpura a amarillo.

E. faecalis es arabinosa-negativo y *E. faecium* arabinosa-positivo. Ocasionalmente otras especies de *Enterococcus* pueden ser aisladas de muestras clínicas, pero en general, no es necesario tratar de identificarlas, a menos que sean resistentes a Vancomicina.

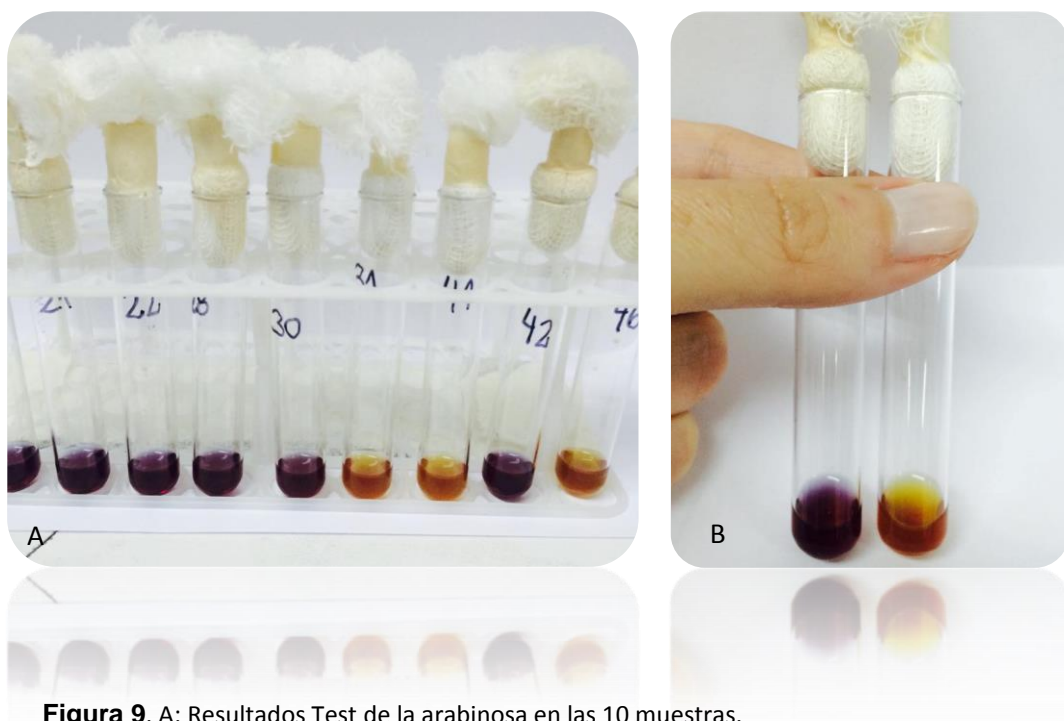


Figura 9. A: Resultados Test de la arabinosa en las 10 muestras.

B: Se observa un resultado positivo (tubo derecho) y uno negativo (tubo izquierdo) para el test.

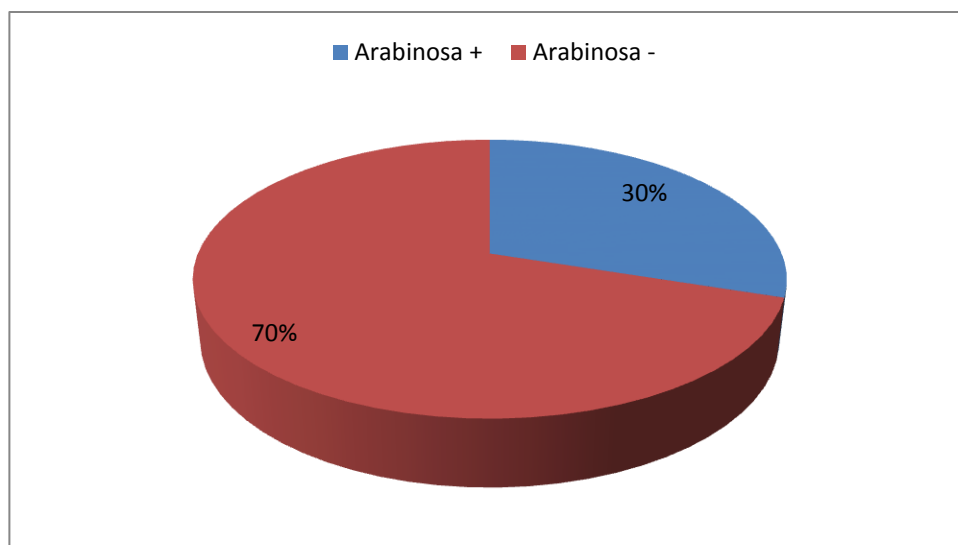


Figura 10. Relación porcentual Test de la arabinosa

De un total de diez muestras sometidas a la prueba, tres resultaron arabinosa positivos y siete arabinosa negativos.

8.8 Seguimiento de pacientes

Transcurrido un periodo determinado, se realizó un seguimiento telefónico de todos aquellos pacientes que aportaron con muestras para esta investigación.

De los 56 pacientes, que aportaron con 60 muestras en total, contestaron el cuestionario 52.

A partir de este total, se desglosa una nueva distribución porcentual según aquellos pacientes que realizaron y que no realizaron el tratamiento de endodoncia de la pieza que aportó con la muestra (figura 11).

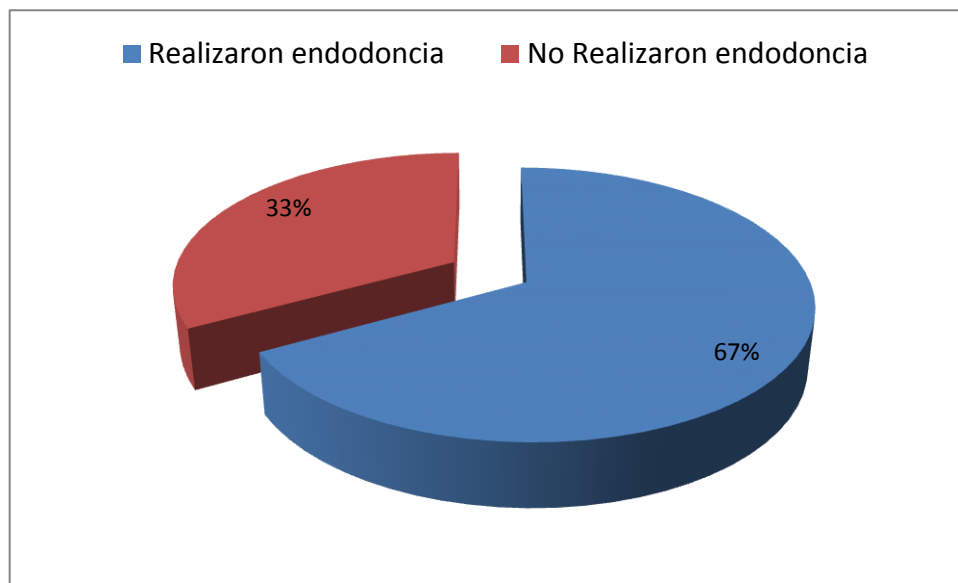


Figura 11. Distribución porcentual de los pacientes que realizaron y que no realizaron el tratamiento endodóntico del diente que aportó con la muestra pulpar.

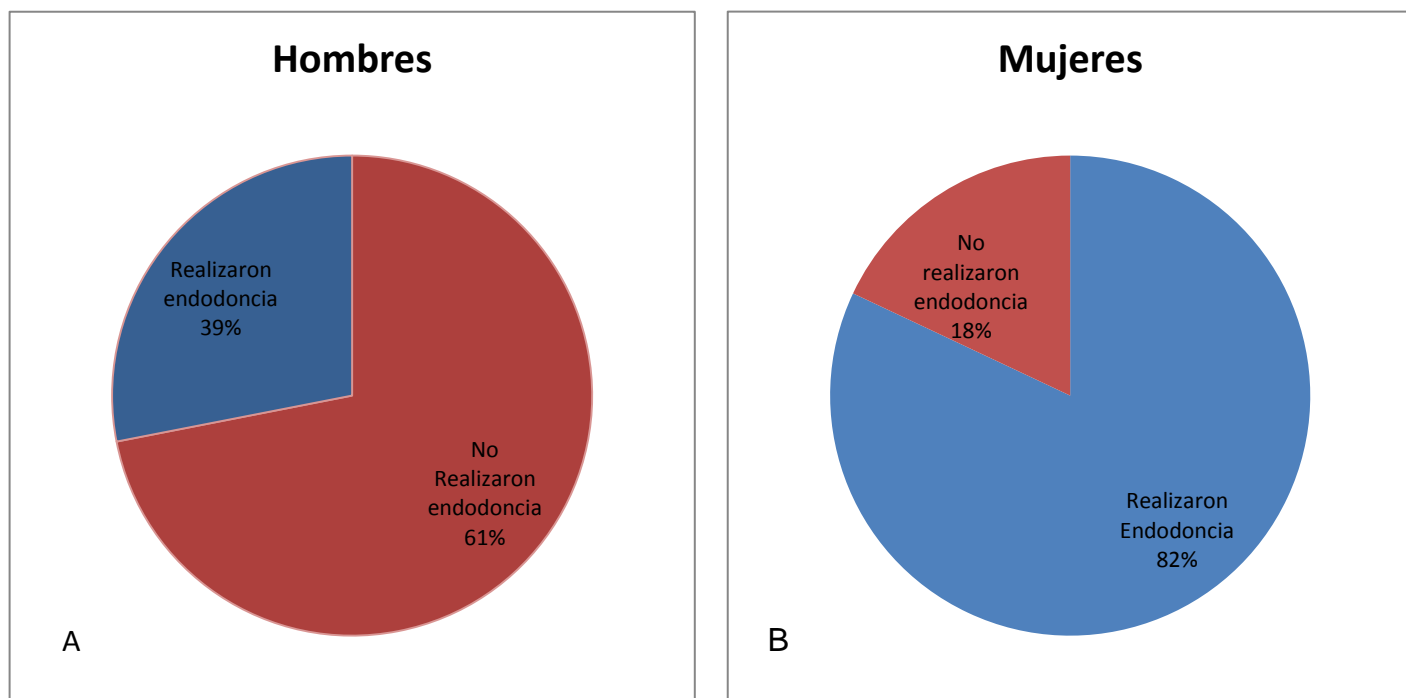


Figura 12. A y B muestran la relación porcentual según sexo, de pacientes que realizaron y no realizaron la endodoncia.

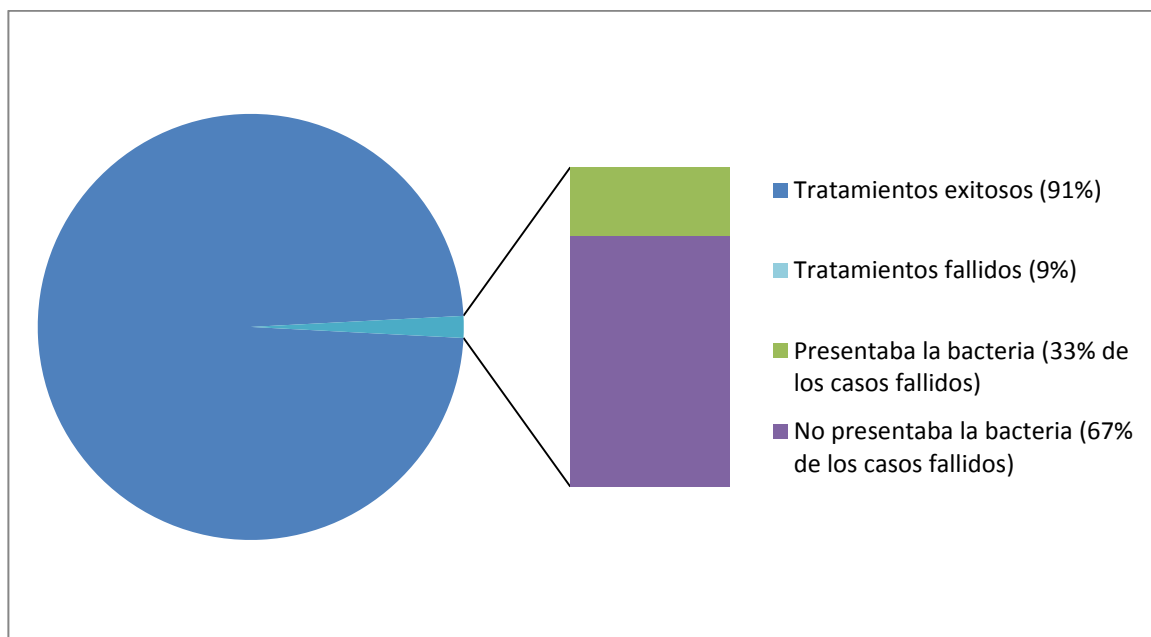


Figura 13. Relación fracasos endodónticos con la presencia de *Enterococcus*

9. Discusión

Se recolectaron 60 muestras bacteriológicas de pulpas dentales, a partir de 56 pacientes cuya indicación terapéutica era trepanación dentaria. Se clasificó el diagnóstico previo cada pieza dental en Pulpitis (sensibilidad positiva y percusión negativa, indistintamente el tipo de pulpitis) y Necrosis Pulpar (sensibilidad negativa y percusión positiva, indistintamente si hay afectación del periápice o no), definiéndose 36 casos de inflamación pulpar y 24 de necrosis (Tabla 1).

Estos resultados, evidenciaron que el diagnóstico más prevalente fue el de pulpitis, lo que coincide con el estudio realizado por Quiñonez, en Cuba el año 2000 que evaluó la prevalencia de lesiones pulpares en 70 pacientes atendidos en dos servicios de urgencias, en donde las lesiones prevalentes fueron las lesiones de tipo agudas ⁽¹⁴⁾. Sin embargo, y en contraste con estos resultados, la literatura describe una inclinación hacia el predominio de lesiones periapicales ⁽¹⁵⁾, es decir, con diagnóstico de necrosis pulpar. Esta diferencia puede ser explicada porque tanto este estudio, como el de Quiñonez, fueron realizados con pacientes atendidos en el servicio público y de urgencias, a donde los pacientes acuden a la atención por fuerte sintomatología asociada a la infección pulpar.

En un estudio realizado por Peters y colaboradores ⁽¹⁶⁾ de la Universidad de Ámsterdam, donde se evaluó la prevalencia de periodontitis apical post-endodoncia en pacientes adultos se encontró semejanzas con el presente estudio y el estudio cubano de Quiñonez, en cuanto a prevalencia de lesiones pulpares según el sexo, siendo esta mayor en pacientes mujeres (52,8% en el estudio de Peters, 65% en el presente estudio) (Figura 2). Este predominio del sexo femenino, podría atribuirse a que las mujeres presentan mayor interés por recibir un tratamiento odontológico para mejorar su estética y funcionalidad, o a que el género femenino podría ser más susceptible a la morbilidad dental.

El total de 60 muestras pulpaes, fueron sembradas en tres tipos de medios de cultivo: Agar Bilis Esculina, Agar MacConkey y Agar Nutritivo, determinando 180 placas (Tabla1).

De las 60 siembras en Agar Bilis Esculina, 18 presentaron crecimiento de colonias bacterianas, lo que corresponde a un 30% de las muestras en ese medio. Al análisis macroscópico de estas 18 placas, se observó que cinco de ellas presentaban características que no correspondían a las esperadas: la muestra 14 y 47 presentaban color blanco con consistencia cremosa. La muestra 34 presentó una coloración más bien amarillenta y con tamaños de colonias mucho mayores a los buscados. Las muestras 43 y 54 también presentaron colonias blanquecinas, de tamaño pequeño y sollevantadas.

Estas cinco muestras quedaron excluidas del resto de las pruebas, y podríamos atribuir este resultado a distintas variables. En el Agar Bilis Esculina no solo crecen las distintas especies de *Enterococcus*, sino que también otras bacterias tales como *Streptococcus* del grupo D. Por otro lado cabe la posibilidad de que la muestra se haya contaminado con alguna levadura al momento de su siembra o que el paciente haya sido el portador.

A las 13 muestras restantes, se les realizó tinción de Gram para el análisis microscópico de las colonias (Figura 7). De este procedimiento, diez muestras fueron Gram positivo y solamente tres Gram negativo, que también quedaron excluidas de nuestra investigación. En el caso de las diez muestras tinción Gram positivas, se observaron las características esperadas y coincidentes con las características morfológicas del género *Enterococcus*, pudiendo así corroborar la identificación de estos microorganismos (Tabla 2).

En el estudio con antibióticos, las muestras de *Enterococcus* presentaron resistencia en distintos grados a algunos antibióticos usados frecuentemente en la clínica odontológica.

En el caso de la Amoxicilina, uno de los antibióticos comúnmente recetado por odontólogos para afecciones pulpares, las 10 muestras presentaron sensibilidad. El tratamiento de elección de las infecciones por *Enterococcus* sin resistencia demostrada consiste en ampicilina o amoxicilina aisladas. Sin embargo, existen reportes de que actualmente tratamientos únicamente con amoxicilina, han resultado fallidos presentado casos de resistencia a ésta.

En el caso de Amoxicilina/Ac. Clavulánico, se obtuvo también una sensibilidad del 100%. Este resultado coincide con el 99% descritos en la literatura ⁽¹⁷⁾.

La amoxicilina Funciona al detener el crecimiento de las bacterias, el ácido clavulánico pertenece a una clase de medicamentos llamados inhibidores de beta-lactamasa que funciona al evitar que las bacterias destruyan la amoxicilina. En general, se recomienda la asociación Amoxicilina/Ac.Clavulánico frente a este género bacteriano, por la reciente aparición de cepas resistente a la Amoxicilina.

Para la Azitromicina, un 70% de las muestras presentaron sensibilidad, dejando al 30% restante como resistente. La Azitromicina es un macrólido que se considera como alternativa a la Amoxicilina en determinados casos de hipersensibilidad a esta. Sin embargo, según esta investigación, presenta algunas resistencias (muestra 31, 41 y 46), que también se evidencian en otros estudios.

Enterococcus, como género, presenta resistencia innata a Clindamicina, por lo que en los antibiogramas realizados, sirvió de control negativo para las

muestras, excepto en el caso de la muestra 30, que con un halo de inhibición de 24mm, mostró sensibilidad a este antibiótico.

Hasta finales de 1980 las infecciones graves por *Enterococcus* fueron tratadas eficazmente con betalactámicos (Penicilina o Ampicilina), pero en enfermos con hipersensibilidad a betalactámicos éstos eran sustituidos por Vancomicina. Es de esperar que en parte por ese motivo, en años recientes, los *Enterococcus* han adquirido resistencias a estos antibióticos, presentando actualmente un gran problema. Este hecho es debido a un grupo de genes que codifican un precursor alternativo de la pared celular, al cual es incapaz de unirse o se une con baja afinidad la Vancomicina, o bien dichos genes eliminan a los precursores de la pared a los que se une esta. Las cepas resistentes se clasifican en función de los fenotipos que presentan, diferenciadas entre sí en función del nivel de resistencia a Vancomicina que presenten.

Los *Enterococcus* resistentes a Vancomicina (ERV) plantean problemas para el tratamiento, puesto que la resistencia suele ser detectada en las cepas de *E. faecium* con resistencia también asociada a Ampicilina. Estas cepas son típicamente resistentes a otros antibióticos, como Eritromicina, Tetraciclina, Fluorquinolonas y Rifampicina, y son resistentes a altas concentraciones de aminoglucósidos ⁽¹⁸⁾.

Es importante tener en mente que el género *Enterococcus* surgió como consecuencia de la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos ya que es intrínsecamente más resistente a los antimicrobianos que otras especies bacterianas. Si esta presión selectiva es muy importante, su repercusión clínica se tornará cada vez más prevalente.

Este estudio presentó siete muestras (70%) Vancomicina-resistentes, corroborando así la información publicada más actualizada respecto a este creciente aumento de resistencia a Vancomicina. Para la detección de

resistencia a Vancomicina en *Enterococcus* mediada por los genes van (que confieren alto grado de resistencia a vancomicina), podemos utilizar varios métodos, todos con buena sensibilidad. Para las cepas con bajo grado de resistencia, métodos como difusión en disco o automatizados rápidos tienen limitaciones para detectarla ⁽¹⁹⁾. Es por eso que podríamos atribuir un alto nivel de resistencia a las bacterias presentadas en este estudio.

La gran mayoría de los *Enterococcus* resistentes a la Vancomicina son cepas de *E. faecium*. Aunque existen cerca de 17 diferentes especies de *Enterococcus*, solamente dos especies son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos: *E. faecalis* y *E. faecium*. La mayoría de los laboratorios sólo necesitan diferenciar estas dos especies bacterianas, ya que la diferenciación de estas dos especies con las otras del mismo género, es relevante solamente cuando se trata de una cepa resistente a Vancomicina.

La diferenciación entre *E. faecalis* y *E. faecium* se puede hacer básicamente con la ayuda de tests microbiológicos, tales como la “acidificación de la arabinosa”, o el test de “Litmus milk” o Leche tornasolada (LM). En este estudio se llevó a cabo el test de la Arabinosa, el cual presentó un resultado positivo para las muestras 31, 41 y 46, correspondientes al 30% de las muestras. Este resultado fue interpretado de acuerdo al viraje de color obtenido en los reactivos, en donde un cambio de color de púrpura a amarillo, indicaba que el microorganismo es capaz de fermentar la arabinosa (monosacárido) como fuente de carbono. De ser así, estaríamos en presencia de *E. faecium*. Por su parte, *E. faecalis* se considera arabinosa negativo, que en el test no manifiesta cambio de color del medio (manteniéndose púrpura)(Figura 9).

Cabe mencionar, que además de *E. faecium*, existen otras especies de *Enterococcus* que son arabinosa-positivas, tales como *E. casseliflavus* o *E.*

gallinarum, sin embargo, no fueron consideradas por tener una muestra poco representativa.

De un total de 60 placas sembradas en Agar MacConkey, se obtuvo crecimiento en solo dos de ellas (Tabla 1). Las colonias de la muestra 54, no cumplían con los requisitos macroscópicos requeridos para ser definida como enterobacteria. Por su parte, a la muestra 40, que sí fue representativa, se le realizó Tinción de Gram y antibiograma de forma simultánea, resultando ambas indicativas de un crecimiento tipo levadura, descartando la presencia de enterobacterias.

Para ver la relación existente entre estos hallazgos microbiológicos y los fracasos en tratamientos de endodoncia, se intentó contactar vía telefónica a los participantes de este estudio. De los 56 pacientes, se logró contactar a 52 para que respondieran el cuestionario propuesto en esta investigación, de los cuales solo 35 (67%) cumplieron con realizarse el tratamiento endodóntico correspondiente (Figura 11). Los hombres cumplieron en un 39%, versus el 82% del sexo femenino (Figura 12).

Una pieza dentaria debe ser trepanada, ya sea por indicación terapéutica, es decir como parte inicial del tratamiento de endodoncia, o bien, por urgencia, en donde el paciente acude a la atención con fuerte sintomatología asociada a la infección pulpar. En este caso, una vez removido el contenido cameral y de los conductos radiculares, y aliviada la sintomatología, es de suma importancia que en el mínimo periodo de tiempo posible se proceda con el sellado endodóntico definitivo. Esta idea se basa en la Teoría del tubo hueco, propuesta por Rickett en 1931⁽²⁰⁾, que plantea que no se puede dejar vacío un conducto, ya que dentistas de la época observaron que al eliminar el tejido pulpar, dejando el conducto vacío, daba como resultado una lesión apical, aún en ausencia de microorganismos, detritus o materiales tóxicos. Las bacterias encuentran el espacio apropiado para desarrollarse y producir una nueva lesión perirradicular

o mantener la lesión preexistente ⁽²¹⁾. Es por eso que la etapa operatoria de obturación y posterior rehabilitación definitiva es lo único que garantiza éxito en el tratamiento y debe ser realizada a corto plazo ⁽¹⁵⁾.

En base a lo expuesto anteriormente, esta investigación requería un porcentaje más alto de pacientes con endodoncias concluidas, ya que de las 35 personas tratadas, tan solo tres (9%) relataron fracaso en su tratamiento, de las cuales solo una presentó uno de los microorganismos en estudio: *Enterococcus faecalis*. Es por eso, que esta muestra tan reducida, no nos permite establecer una relación entre el fracaso endodóntico y la presencia de *Enterococcus* o enterobacterias, por lo tanto, nuestra hipótesis de investigación no es concluyente.

Es por el mismo motivo que también se hace imposible establecer una relación entre la resistencia de estos microorganismos a diferentes antibióticos con la permanencia de ellos en los conductos radiculares luego del tratamiento de endodoncia.

Dentro de la microflora normal de la cavidad oral, también podemos encontrar microorganismos no habituales provenientes de otros lugares. Pese a que el género *Enterococcus* es comensal del intestino humano, demostramos en este trabajo que también se hace presente en la cavidad oral, incluso dentro de la cavidad pulpar, tal como se reporta en la literatura.

En cuanto a las enterobacterias, aunque no se haya evidenciado su presencia en las pulpas estudiadas, no descartamos que en un universo más amplio de muestras pueda ser encontrada.

Otras de las evidencias que deja nuestro estudio, es la presencia de otros microorganismos en las infecciones dentales, además de los organismos bacterianos, como lo son las levaduras. Una infección por levaduras, es un problema causado por el crecimiento excesivo de un hongo, el cual puede

infectar las áreas húmedas de la piel, incluyendo la mucosa oral. Es preciso mencionar que las levaduras solo causan problemas cuando hay demasiados organismos de levadura, lo que puede ser causado por diferentes factores, como por ejemplo la inmunodeficiencia o consumo de diferentes tipos de medicamentos.

10. Conclusiones

Existe un 16% de probabilidad de encontrar *Enterococcus spp.* en pulpas dentales infectadas.

No encontramos presencia de enterobacterias en pulpas dentales infectadas.

El género *Enterococcus* posee sensibilidad frente a Amoxicilina, Amoxicilina/Ac. Clavulanico y Azitromicina y una resistencia natural a Clindamicina.

El género *Enterococcus* ha sido capaz de adquirir resistencia a la Vancomicina.

No es posible determinar una relación entre la resistencia de estas bacterias con los fracasos endodónticos, ni tampoco su permanencia en los conductos radiculares tratados.

No es posible comprobar la hipótesis experimental de este trabajo en base a la baja recurrencia de los fracasos endodóntico en nuestro universo.

11. Sugerencias

Se sugiere realizar un estudio con un mayor universo, para aumentar la casuística, y evaluar si los microorganismos encontrados en nuestro trabajo se repiten en otras muestras pulpaes infectadas.

Se sugiere aumentar la cantidad de muestras debido a la poca recurrencia de los fracasos endodónticos.

Se sugiere realizar la continuación de este estudio con pacientes que acuden a realizar el tratamiento de endodoncia y no con pacientes de urgencia.

Además incluir en la evaluación la causa del fracaso endodóntico y formar nuevos criterios exclusión muestral.

Se sugiere la realización de pruebas bioquímicas más específicas para la identificación bacteriana.

12. Bibliografía

- 1 “Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections”. William W L Hsiao, Kevin L Li, Zhenqiu Liu³, Cheron Jones, Claire M Fraser-Liggett and Ashraf F Fouad.
BMC Genomics. 2012 Jul 28;13:345.
- 2 <http://endo5009xochimilco.blogspot.com/2010/antibiloticos.html>
- 3 “Endodontic Microbiology”. Ashraf F. Fouad.
UK: Wiley-Blackwell (Editorial)
- 4 “Analysis of *Enterococcus Faecalis* in samples from turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR Sybr Green method”. Selcuk M. OZBEK, Ahmet OZBEK, Aziz S. ERDOGAN.
J Appl Oral Sci. 2009;17(5):370-4
- 5 http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
- 6 “The spectrum of infections and the resistance to antibiotics of enterobacter species”. Radu, Stefan, Idomir.
Bulletin of the Transilvania University of Brasov, Series VI: Medical Sciences. 2012, Vol. 5 Issue 2, p51-56.
- 7 “Antibiotic Resistance and Capacity for Biofilm Formation of Different Bacteria Isolated from Endodontic Infections Associated with Root-filled Teeth”
Al-Ahmad, Ali; Ameen, Hawnaz; Pelz, Klaus; Karygianni, Lamprini; Wittmer, Annette; Anderson, Annette C.; Spitzmüller, Bettina; Hellwig, Elmar.
Journal of Endodontics. February 2014 40(2):223-230

8 “Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment in Patients with Antibiotic-resistant Microflora: A Preliminary Report”

Aguinaldo S. Garcez, Silvia C. Nuñez, Michael R. Hamblim, Hideo Suzuki*,Martha S. Ribeiro.

Journal Endodontic 2010, Sep; 36(9):1463-6.

9 “Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights”.

Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L
Department of Operative Dentistry and Periodontology. Plos One 2012; Vol. 7 (11), pp. e49

10 “El éxito en endodoncia”

R. Hilú1, F. Balandrano Pina. ENDODONCIA 2009

<http://www.medlinedental.com/pdf-doc/ENDO/v27-3-7.pdf>

11 “Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in Enterococcus faecalis recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment”.

Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, Niu W.

Department of Endodontics and Periodontics, College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian, China.

Journal Of Endodontics 2011 May; Vol. 37 (5), pp. 631-6.

12 “Microorganism from Canals of root-filled teeth with periapical lesions”

Pinheiro ET, Gomez BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB.

Int Endod J 2003; 36 1-11

13 Procedimientos en microbiología: “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología”

Ana Fernandez Olmos, Celia García de la Fuente, Juan Antonio Saez Nieto, Sylvia Valdezate Ramos.

www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf

14 “Patologías pulpares y periapicales más frecuentes en urgencias en 2 clínicas estomatológicas”.

Quiñonez D. Rev Cubana Estomatol, 2000;37 (2): 84-88.

15 PREVALENCE OF PULP LESIONS IN PATIENTS TREATED WITH ENDODONTIC TREATMENT AT THE DENTAL CLINIC OF DENTAL SCHOOL OF UNIVERSITY DEL VALLE.

Ángela Sofía Gaviria, Marín Quintero, Angela Patricia Z., Patricia Rodríguez. Colombian Journal of Dental Research, vol.3, N°7, 2012.

16 “Prevalence of apical periodontitis relative to endodontic treatment in an adult Dutch population: a repeated cross-sectional study”.

Peters LB, Lindeboom JA, Elst ME, Wesselink PR.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;111(4):523-528.

17 “ Sensibilidad a los antimicrobianos de Enterococcus faecalis aislados de pacientes en la provincia de Córdoba (España)”

M. Causse, F. Franco-Álvarez de Luna, A.D. García-Mayorgas, F.C. Rodríguez y M. Casal

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba (España). Rev Esp Quimioterap, Junio 2006; Vol. 19 (Nº 2): 140-143

18 “Treatment of the infections by enterococcus”.

J A. Girón-González, R. Pérez-Canoa.

Rev Clin Esp.2003;203:482-5 - Vol. 203

19 “Enterococos resistentes a vancomicina: ¿Infección emergente inminente?”

HÉLIO S.SANDER.

Rev. chil. infectol. v.19 supl.1 Santiago 2002.

20 Rickert UG, Dixon CM. The controlling of root surgery. Internat Dent Congress (8th) Tr Suppl, 1931;Sec IIIa: 15-22.

21. “Factors associated with endodontic treatment failures”

Lin LM, Skribner JE, Gaengler P J. Endodon. 1992;18:625-627

13. Anexos

Cuestionario seguimiento paciente

1. Corroboración de datos:

Nombre: _____

Rut: _____

Sexo: _____

Fecha y lugar trepanación: _____

2. Datos nuevos:

Sintomatología durante los 3 primeros días posteriores a la trepanación: Sí / No

Sintomatología posterior a los 3 días posteriores a la trepanación: Sí / No

Realizó tratamiento de conducto de la pieza trepanada: Sí / No

Tiempo transcurrido desde la trepanación al inicio del tratamiento: _____ días.

Sintomatología posterior al tratamiento: Sí / No

Necesidad de rehacer el tratamiento endodóntico: Sí / No



Facultad de Odontología
Departamento de Microbiología y Biotecnología Oral

Obj: Presentación Proyecto de Investigación

Santiago, 21 de Abril 2014

DE: Departamento de Microbiología y Biotecnología Oral.
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello.

A: Sra. Marla Solari
Directora CESFAM Cristo VIVE

Comité Bioética de CESFAM Cristo Vive

Por medio de la presente vengo a presentar a Ud. Proyecto de investigación para evaluación de factibilidad de aplicación en el CESFAM Cristo Vive.

1.- Título: *“Estudio para determinar la prevalencia de Enterobacterias y Enterococcus spp. en pulpas dentales extraídas por indicación de trepanación”**

2.- Objetivo: Determinar si el desarrollo pulpitis dolorosa irreversible se asocia al desarrollo de bacterias específicas dentro de la pulpa dental y el rol que juegan aquellos microorganismos en la enfermedad pulpar, que corresponde a una de las afecciones dentales más frecuentes y dolorosas para el paciente odontológico.

3.- Metodología: Evaluación a través de pruebas microbiológicas de restos pulpares provenientes de la trepanación dentaria.

En pacientes con diagnóstico de pulpitis dolorosa irreversible, sin distinción de edad o género.

Numero de muestras aproximadas: 50

Duración : 2 meses

Horario: lunes a viernes de 8.00 a 10.00 (horario de Urgencia del CESFAM).

Inicio Investigación: De acuerdo a disponibilidad de su servicio

Este estudio se hace en el marco de trabajo de titulación de alumnos de 6to año, de la carrera de Odontología de la Universidad Andrés Bello y bajo dirección del departamento de Microbiología y Biotecnología Oral de la misma universidad, donde se desempeña la Dra. María Jesús Villegas, Cirujano Dentista y funcionaria de su centro de Salud, quien es tutor asociado de esta investigación. El tutor principal del trabajo es el Dr. Mauricio Bittner Ortega, PhD en Bioquímica y Microbiología. Las alumnas operadoras y solicitantes son: Paulina Cortés Gutiérrez y Margarita Orellana Pizarro, ambas licenciadas en odontología y alumnas de 6° año de la carrera.

Para el procedimiento de recolección de restos pulpares, no se alterará en nada el desempeño habitual del trabajo del servicio dental, ya que normalmente estos restos son desechados y en este caso previa autorización bajo consentimiento informado (anexo N°1) por

escrito y firmado por el paciente, estos restos pulpares serán almacenados en tubos de ensayo y transportado al Laboratorio Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad Andrés Bello para su análisis microbiológico.

Es de destacar que la participación por parte de los usuarios es totalmente voluntaria, en ningún caso implica pagos al usuario o a personal del CESFAM. No implica distracción del tiempo laboral del personal de CESFAM y no considera en ningún tipo de reclutamiento o llamado a participar. Es una investigación de carácter pasivo y sin intervención de los procedimientos habituales del Servicio.

Es posible que la participación en este estudio no tenga un beneficio directo, sobre los usuarios o el CESFAM Cristo Vive. Sin embargo, la identificación de una correlación entre *Enterobacterias* y *Enterococcus* con la pulpitis de tipo irreversible, eventualmente podría contribuir a un mejor conocimiento de este cuadro y acercarnos a postular un tratamiento con un enfoque más directo, para dicha patología. Esperamos que esta investigación pueda contribuir de forma significativa a la odontología, y nos haga partícipes del Congreso de Estudiantes de Odontología de este año 2014 además de otros concursos y publicaciones.

La investigación quedaría en toda etapa a su disposición para control o auditora pertinentes, por parte de su servicio. Sin embargo, los autores se comprometen a mantener informado a la Dirección del CESFAM con avances y el trabajo final, en caso de no solicitarlo directamente. En las publicaciones el CESFAM será considerado y mencionado como partícipe de dicha investigación.

A modo de retribuir su tiempo y disposición por parte de los investigadores se hará una donación en materiales dentales por la suma de 8 UF., de acuerdo a solicitud o necesidad del servicio dental del CESFAM, tales como mascarillas, gorros quirúrgicos, guantes, entre otros.

Sin otro particular y en espera de una favorable acogida por parte de su servicio, se despide muy agradecida por su disponibilidad

Paulina Cortés G.
Licenciada en Odontología
Investigador

Margarita Orellana P.
Licenciada en Odontología
Investigador

Dra. M Jesús Villegas V.
Cirujano Dentista
Tutor Asociado

Dr. Mauricio Bittner O.
PhD. Bioquímica y Microbiología
Jefe Departamento Microbiología y
Biotecnología Oral
Tutor Principal

CONSENTIMIENTO INFORMADO

A través del presente invitamos a Ud. a participar de un trabajo de investigación titulado: "Estudio para determinar la prevalencia de Enterobacterias y Enterococcus spp. en pulpas dentales extraídas por indicación de trepanación", el cual tiene por objetivo determinar si el desarrollo pulpitis dolorosa irreversible se asocia al desarrollo de bacterias específicas dentro de la pulpa dental y el rol que juegan aquellos microorganismos en la enfermedad pulpar.

Para ser llevado a cabo requerimos utilizar los restos pulpares desechados en el procedimiento endodóntico que se les efectuará independiente de su participación en el estudio, para su análisis microbiológico en el laboratorio.

Reiteramos que su participación en este estudio no modifica en absoluto el procedimiento dental al cual será sometido y es absolutamente voluntario. No tiene riesgo, costo ni retribución económica alguna para el paciente.

De aceptar participar en el presente estudio, se le solicitará rellenar un cuestionario breve, de carácter anónimo con datos clínicos necesarios para análisis de posibles variables involucradas en los resultados obtenidos. Además, usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito.

Usted puede retirarse de la investigación o no participar de ella sin sanción alguna

El beneficio que se obtendrá de esta investigación, será contribuir a los estudios y líneas de investigación para mejores tratamientos odontológicos, con enfoques más directos.

Se informa además que los datos serán confidenciales y las muestras de uso exclusivo para este estudio y sin ningún otro fin.

AUTORIZACIÓN:

Yo, _____, R.U.T. _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FECHA: _____